

Use of protein fractions from okra seeds - in cosmetics e.g. as replacement for casein in skin and hair care products

Patent Number : WO9846205

International patents classification : A61K-006/00 A61K-007/00 A61K-007/48 A01N-065/00 A61K-007/06 A61K-035/78

• Abstract :

WO9846205 A Use of protein fractions from Hibiscus esculentus (or okra) seeds in cosmetic compositions is new.

USE - The protein extract(s) are used e.g. as a replacement for lactic casein in cosmetic skin and hair care preparations such as face creams, body lotions, solar preparations, hygiene products, anti-wrinkle creams, shampoos, conditioners, permanent waving compositions or hair dyes.

ADVANTAGE - The okra seed proteins are wholly vegetable in origin, have better solubility properties than casein, and provide excellent cell nutritive properties, good softening and biofilmogenic properties, and have good anti-irritant, conditioning, restructuring, photoprotective, soothing, and anti-ageing action. (Dwg.0/6)

• Publication data :

Patent Family : WO9846205 A1 19981022 DW1998-49 A61K-007/48 Fre 30p * AP: 1998WO-FR00715 19980408 DSNW: AU CA JP KR US DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FR2762211 A1 19981023 DW1998-49 A61K-007/48 AP:

1997FR-0004853 19970416

AU9873400 A 19981111 DW1999-12 A61K-007/48 FD: Based on WO9846205 AP: 1998AU-0073400 19980408

EP-975322 A1 20000202 DW2000-11 A61K-007/48 Fre FD:

Based on WO9846205 AP: 1998EP-0920593 19980408; 1998WO-FR00715 19980408 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

KR2001006358 A 20010126 DW2001-52 A61K-007/48 AP: 1999KR-0709444 19991014

JP2001518910 W 20011016 DW2001-76 A61K-007/00 31p FD:

Based on WO9846205 AP: 1998JP-0543552 19980408; 1998WO-FR00715 19980408

EP-975322 B1 20020313 DW2002-19 A61K-007/48 Fre FD:

Based on WO9846205 AP: 1998EP-0920593 19980408; 1998WO-FR00715 19980408 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

DE69804203 E 20020418 DW2002-34 A61K-007/48 FD: Based

on EP-975322; Based on WO9846205 AP: 1998DE-6004203

19980408; 1998EP-0920593 19980408; 1998WO-FR00715 19980408

US6379719 B1 20020430 DW2002-35 A61K-006/00

AP: 1998WO-FR00715 19980408; 1999US-0403256 19991018;

2000US-0713209 20001116

ES2175706 T3 20021116 DW2003-02 A61K-007/48 FD: Based

on EP-975322 AP: 1998EP-0920593 19980408

Priority n° : 1997FR-0004853 19970416

Covered countries : 24

Publications count : 10

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (SERO-) LAB SEROBIOLOGIQUES SA (COGN-) COGNIS FRANCE SA

Inventor(s) : PAULY G; GILLES P

• Accession codes :

Accession N° : 1998-583221 [49]

Sec. Acc. n° CPI : C1998-174442

• Derwent codes :

Manual code : CPI: D08-B03 D08-B04

D08-B05 D08-B06 D08-B09A

Derwent Classes : D21

• Update codes :

Basic update code : 1998-49

Equiv. update code : 1998-49; 1999-12; 2000-11; 2001-52; 2001-76; 2002-19; 2002-34; 2002-35; 2003-02

Others :

UE4

2001-09; 2001-12; 2002-03; 2002-05; 2002-06; 2003-01

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 7/48, 7/06	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/46205
		(43) Date de publication internationale: 22 octobre 1998 (22.10.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00715	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 8 avril 1998 (08.04.98)	
(30) Données relatives à la priorité: 97/04853 16 avril 1997 (16.04.97) FR	Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORATOIRES SEROBIOLOGIQUES (SOCIÉTÉ ANONYME) [FR/FR]; F-54425 Pulnoy (FR).	
(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): PAULY, Gilles [FR/FR]; 7, rue de la Côte Verte, F-54280 Seichamps (FR).	
(74) Mandataire: CABINET NUSS; 10, rue Jacques Kablé, F-67080 Strasbourg Cedex (FR).	

(54) Title: USE IN COSMETICS OF A PROTEIN FRACTION EXTRACTED FROM OKRA SEEDS

(54) Titre: UTILISATION D'UNE FRACTION PROTÉIQUE EXTRAITE DE GRAINES D'HIBISCUS ESCULENTUS EN COSMÉTIQUE

(57) Abstract

The invention concerns the use of at least one protein fraction extracted from okra seeds and a cosmetic composition containing same. It concerns the use of a soluble protein fraction extracted from Hibiscus esculentus or Okra seeds as a substitute for casein in a cosmetic composition or product, said composition comprising between 0.01 % and 50.00 % of said fraction.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet une utilisation d'au moins une fraction protéique extraite de graines d'Hibiscus esculentus et une composition cosmétique comportant une telle fraction. Utilisation d'au moins une fraction protéique soluble extraite de graines d'Hibiscus esculentus ou Okra en tant que substitut de caséine dans une composition ou un produit cosmétique, ladite composition comportant entre 0,01 % et 50,00 % de ladite fraction.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

- 1 -

UTILISATION D'UNE FRACTION PROTEIQUE EXTRAITE DE GRAINES D'HIBISCUS ESCULENTUS EN COSMETIQUE

La présente invention concerne le domaine de la cosmétologie, notamment les applications cutanées et capillaires, et a pour objet l'utilisation d'au moins une fraction protéique extraite d'Hibiscus esculentus ainsi qu'une composition comportant au moins un tel extrait.

5 L'Hibiscus esculentus (Abelmoshus esculentus ou okra - famille des Malvacées) est une plante d'origine africaine, introduite aux Etats-Unis et aux Indes de l'Est sous le nom espagnol de gumbo. C'est une des espèces botaniques cultivée pour ses gousses depuis plus de 2000 ans.

10 L'okra pousse dans de nombreuses régions du monde, telles que l'Inde, la Malaisie, les Philippines, l'Amérique (Middle-West), les régions méditerranéennes, l'Afrique et, plus généralement, au niveau des régions tropicales.

15 Les fruits (gousses), consommés à l'état jeune comme légumes, sont longs, verts et effilés ; ils présentent une saveur délicate et une texture interne mucilagineuse.

En dehors des gousses, intéressantes par le mucilage qu'elles contiennent, les graines d'Hibiscus esculentus ont également fait l'objet d'études afin d'étudier leur potentiel comme source nouvelle de protéines.

20 A cet effet, la composition chimique de la graine entière de différentes variétés d'okra (enveloppe + endosperme) a été déterminée.

De même, les propriétés (solubilité protéique, composition en acides aminés, capacité d'émulsion, capacité de moussage, valeur nutritionnelle) de différents produits obtenus à partir des graines (farine entière préparée à partir de graines dépelliculées, farine délipidée, concentré et isolat protéique) ont été
25 étudiés dans un but alimentaire (voir par exemple BRYANT LA, MONTECALVO J, MOREY KS, LOY B : "Processing, functional and nutritional properties of Okra seed products", Journal of food science, vol 53 n° 3, 818-816).

La graine d'Okra contient par rapport à la matière sèche principalement les substances suivantes en % en poids :

- 30
- 17,7 à 21,8 % de protéines,
 - 14,7 à 20,06 % de lipides,
 - 4,33 à 4,62 % de cendres,
 - 6,84 à 7,92 % d'eau,

- 2 -

- 0,0032 % de gossypol,

et notamment à l'état de traces, les substances suivantes :

- Calcium : 282,26 mg/100g,

- Fer : 10,26 mg/100g,

5 - Thiamine : 0,69 mg/100g,

- Riboflavine : 0,14 mg/100g,

- Niacine : 4,01 mg/100g,

- α -tocophérol : 30,4 mg/100g.

(Voir à ce sujet KARAKOLTSIDIS PA, CONSTANTIDINES SM :

- 10 "Okra seed : a new protein source", J. Agric Food Chem., 1975, 23 n° 6, 1204-1207 / WANDAWI AL : "Chemical composition of seeds of two okra cultivars Abelmoschus esculentus", Journal of agricultural and food chemistry, 1983, 31 n° 6, 1355-1358).

- 15 La composition en acides aminés des protéines de la graine d'Hibiscus esculentus concentrés ou des isolats protéiques est voisine de celle des protéines de soja et proche de celle de la caséine (voir tableau ci-dessous).

Acide aminé g/16 g d'azote	Hibiscus (graines) KARAKOLTSI- DIS et al MANDAWI AL	Hibiscus (graines) BRYANT et al	Concentré protéique BRYANT LA et al	Isolat protéique BRYANT LA et al	Soja (graine) KARAKO- TSIDIS et al	Caséine KARAKO- TSIDIS et al
Asp	11,82 à 15,47	11,57	10,89	12,12	17,00	7,11
Thr	3,02 à 4,38	2,86	3,37	2,90	5,47	4,65
Ser	5,25 à 6,71	5,07	5,23	4,97	7,42	6,02
Glu	20,48 à 22,08	15,91	19,15	17,35	21,05	21,19
Pro	3,83 à 6,06	3,79	4,88	4,98	7,71	11,54
Gly	5,79 à 6,66	4,78	7,77	4,16	4,32	1,97
Ala	5,89 à 6,66	4,83	4,53	4,59	6,13	3,07
Val	4,0 à 6,4	4,24	4,42	4,33	5,26	6,72
Cys	1,54 à 2,53	3,63	1,89	1,90	1,61	0,36
Met	1,29 à 1,85	1,83	2,18	2,21	1,25	2,78
Ile	3,15 à 4,65	2,96	3,06	3,13	4,46	5,40
Leu	6,68 à 8,47	6,21	6,96	6,97	9,35	9,49
Tyr	3,6 à 3,83	3,46	5,15	4,03	3,72	5,81

- 3 -

Phe	3,93 à 4,7	4,41	4,80	4,85	5,26	5,23
Lys	7,24 à 8,9	6,22	6,19	6,47	8,00	8,80
His	1,78 à 2,99	2,34	3,61	3,83	2,67	2,91
Arg	11,04 à 12,46	11,17	10,02	9,98	10,07	3,74
Trp	0,85 à 0,96	2,02	2,57	2,03	nd	nd

Par rapport à la caséine, on note notamment des teneurs voisines en thréonine, en sérine, en acide glutamique, en valine, en isoleucine, en leucine, en phénylalanine, en lysine et en histidine.

5 Les différents travaux précités mettent donc en évidence l'intérêt des graines d'*Hibiscus esculentus* comme sources potentielles de protéines d'un point de vue alimentaire.

10 Par ailleurs, on connaît également l'utilisation à des fins dermatologiques d'un produit liquide visqueux obtenu par extraction à chaud et/ou sous pression des fruits d'*Hibiscus esculentus* (FR-A-2 679 443), ainsi que l'utilisation d'un matériau poudreux composé de polysaccharide extrait de graines immatures d'*Hibiscus esculentus* dans un produit cosmétique (JP-A-57/199969).

15 Or, les inventeurs ont constaté qu'il était possible d'utiliser directement des extraits de graines d'*Hibiscus esculentus* en cosmétique et que l'utilisation d'au moins une fraction protéique, préférentiellement soluble, extraite de graines d'*Hibiscus esculentus* ou Okra, notamment en tant que substitut de caséine, dans une composition ou un produit cosmétique permettait d'obtenir une composition ou un produit présentant des propriétés spécifiques surprenantes et avantageuses.

20 Ainsi, il a été constaté un fort pouvoir nutritif cellulaire, un effet adoucissant et biofilmogène, des effets conditionneurs, restructurants et réparateurs, ainsi que des effets anti-irritant, photoprotecteur, apaisant et anti-vieillessement cutané.

25 Les extraits précités peuvent être utilisés non seulement pour des applications de soins et d'hygiène de la peau (produits pour le visage ou pour le corps, produits de jour ou de nuit, produits solaires, produits d'hygiène anti-rides, produits amincissants), mais également dans le domaine des soins et de l'hygiène capillaires (lotions ou shampooings ; crèmes ; mousses ; produits protecteurs, réparateurs, adoucissants, filmogènes et photoprotecteurs ; produits pour
30 permanentes et de coloration).

- 4 -

La préparation des protéines peut être réalisée par les techniques conventionnelles d'extraction des protéines végétales et de préparation des concentrés ou isolats protéiques, connus de l'homme de l'art et décrits notamment dans l'article de BRYANT LA, MONTECALVO J, MOREY KS et LOY B
5 précité.

La matière première est constituée par des graines ou de la farine de graines d'Hibiscus esculentus (teneur en protéines = 21,6 % par rapport à la matière sèche).

La farine ainsi obtenue peut être délipidée par extraction dans de
10 l'héxane à 45° C (avantageusement 3 extractions successives).

Le rendement en huile est de 16,2 à 23,9 % en poids selon que l'on part d'une farine de graines "totale" ou d'une farine de graines partiellement débarrassée des enveloppes ou coques par tamisage.

Les farines délipidées et partiellement débarrassées des coques des
15 graines contiennent entre 37 et 44 % en poids de protéines (N x 6,25).

A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs, on décrira ci-après différents procédés d'obtention et de préparation d'extraits de graines d'Hibiscus esculentus ou Okra.

Exemple 1 :

20 On ajoute 100 g de farine enrichie (débarrassée partiellement des débris de coques) non délipidée dans un litre des milieux suivants :

- eau distillée,
- eau distillée contenant 1 g/l de NaCl,
- eau distillée contenant 5 g/l de NaCl,
- 25 - eau distillée contenant 10 g/l de NaCl.

Après 15 minutes d'agitation, le pH de la solution est ajusté à 9 avec NaOH 4 N.

L'extraction est menée pendant une heure et demi à température ambiante en maintenant le pH à 9.

30 Après centrifugation, la couche lipidique supérieure est éliminée et le surnageant aqueux est recueilli.

Le surnageant de couleur jaune d'or est ajusté à pH = 7,5, puis filtré jusqu'à 0,22 µm ; on note que plus la teneur en sels du solvant est importante, plus la filtration est facile.

35 La teneur en protéines du filtrat est déterminée par la méthode du Biuret. Les surnageants restent opalescents.

On obtient les résultats suivants :

- 5 -

Solvant d'extraction	Protéines dans l'extrait filtré Biuret (g/l)
Eau distillée	16,9
NaCl 1 g/l	13,3
NaCl 5 g/l	9,5
NaCl 10g/l	10,2

Exemple 2 :

5 On ajoute dans 250 ml d'eau distillée contenant 5 g/l de chlorure de sodium, 25 g de farine délipidée enrichie (débarrassée des débris des coques).

Après 15 minutes d'agitation, le pH de la solution est ajusté selon l'essai aux pH suivants : 6-6,5-7-7,5.

L'extraction est menée pendant une heure à température ambiante.

10 Après centrifugation, le surnageant est récupéré puis filtré sur 5µm.

On obtient les résultats suivants :

pH	Protéines Biuret (g/l)	Protéines (N x 6,25) (g/l)
6	12,5	13,8
6,5	13,3	14,8
7	14,6	15,1
7,5	15,5	16,1

Exemple 3 :

15 On ajoute, dans 250 ml d'eau distillée contenant 5g/l de chlorure de sodium, 25 g de farine délipidée enrichie.

Après 15 minutes d'agitation, le pH de la solution est ajusté à 8.

L'extraction est menée pendant 6 heures à température ambiante.

20 Après centrifugation, le surnageant est récupéré et le pH ajusté à 7,5, puis la solution est filtrée sur 5µm.

On obtient les résultats suivants :

- 6 -

Durée (heures)	Protéines Biuret (g/l)
2	18,45
4	20,3
6	19,7

Exemple 4 :

On ajoute dans 250 ml d'eau distillée contenant 5 g/l de chlorure de sodium, 25 g de farine délipidée enrichie.

5 Après 15 minutes d'agitation, le pH de la solution est ajusté à pH 7,5. L'extraction est menée pendant 6 heures à 45° C.

Après centrifugation, le surnageant est récupéré, son pH est ajusté à 7.5. puis la solution est filtrée sur 5µm.

On obtient les résultats suivants :

10

Durée (heures)	Protéines Biuret (g/l)
2	18,0
4	18,1
6	13,8

Exemple 5 :

On ajoute dans 3l d'eau distillée contenant 5 g/l de chlorure de sodium, 300 g de farine délipidée enrichie.

15 Après 15 minutes d'agitation, le pH de la solution est ajusté à pH 7,5. L'extraction est menée pendant 2 heures à 50° C.

Après centrifugation, le surnageant est récupéré puis filtré sur 5µm.

On obtient les résultats suivants :

Protéines Biuret : 13,7 g/l

20 Protéines kjeldahl : 14,6 g/l

Un litre de surnageant est prélevé et son pH est ajusté à 4,5 avec de l'acide sulfurique 4N.

Après 30 minutes d'agitation, la solution est centrifugée et le précipité est recueilli, puis lavé par de l'eau à pH 4,5. Il est ensuite lyophilisé : on
25 obtient une poudre dont la teneur en protéines est de 85,3 % en poids.

- 7 -

Exemple 6 :

On ajoute, sous agitation dans un réacteur thermostaté, 600 g de farine délipidée enrichie dans 6 litres d'eau distillée contenant 5g/l de NaCl. Le pH mesuré est ajusté à 7,5.

5 La solution est pompée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique dans un tube ultrasonique à passage intégral (puissance des ultrasons 600 W - fréquence 20 000 Hz), le débit étant de 60 l/h.

Deux passages discontinus par charges successives sont réalisés (l'extrait est recueilli après passage dans le tube ultrasonique dans un second réacteur).

Après centrifugation, puis filtration sur 5µm, on obtient les résultats suivants :

- protéines de l'extrait après le premier passage : 14,2 g/l
- protéines de l'extrait après le deuxième passage : 15,2 g/l

15 Exemple 7 :

On ajoute dans un réacteur thermostaté sous agitation, 300 g de farine délipidée enrichie dans 6 litres d'eau distillée contenant 5 g/l de NaCl. Le pH mesuré est ajusté en continu à 7,5.

20 La solution est introduite pendant une heure, en continu et en circuit fermé, dans le tube ultrasonique à passage intégral de l'exemple 6 (puissance des ultrasons : 700 W - fréquence : 20 000 Hz), le débit étant de 60 l/h.

Une circulation d'eau froide permet de maintenir la température de la solution dans la cuve à environ 33° C.

25 Des prélèvements sont effectués après 15 min, 30 min et 45 min d'extraction.

Après centrifugation, puis filtration sur 5 µm des extraits, on obtient les résultats suivants :

Durée d'extraction (min)	Protéines dans l'extrait filtré Biuret (g/l)
15	8,23
30	8,56
45	8,89
60	9,89

- 8 -

Exemple 8 :

Dans un réacteur, on introduit 25,0 Kg d'eau distillée et on réalise successivement les opérations suivantes :

- 5 de graines d'Hibiscus entières,
 - disperser sous agitation 2,5 Kg de farine totale obtenue par broyage
 - ajuster le pH à 9, avec NaOH 4N, après 15 minutes de dispersion,
 - extraire sous agitation pendant 2 heures à température ambiante en maintenant le pH à 9 par ajout de NaOH 4N,
 - centrifuger pendant 10 minutes à 5000 g,
 - 10 - récupérer le surnageant beige trouble,
 - ajuster le pH à 7,5 par addition de H₂SO₄ 4N,
 - centrifuger,
 - clarifier par une nouvelle centrifugation,
 - récupérer le surnageant opalescent,
 - 15 - filtrer jusqu'à 0,5 µm,
 - récupérer le surnageant,
 - atomiser.

On peut alors récupérer une poudre beige clair avec un rendement d'atomisation de 62,7 % en poids.

Exemple 9 :

En première variante de l'exemple 8, on peut également réaliser les opérations suivantes :

- ajuster le pH d'une partie de l'extrait préparé selon l'exemple 8 à 4,1 par addition de H₂SO₄ 4N,
- 25 - laisser reposer à + 4° C (formation d'un précipité - environ 50 % du volume total),
 - centrifuger à 5000 g pendant 15 mn,
 - laver les culots avec de l'eau distillée à pH = 4,1,
 - centrifuger à 5000 g pendant 15 mn,
 - 30 - recueillir le précipité,
 - reconstituer le précipité dans de l'eau distillée (10 % du volume avant précipitation),
 - ajuster le pH à 7,5 en ajoutant sous agitation NaOH 4N,
 - homogénéiser pour favoriser la solubilisation et l'homogénéisation,
 - 35 - centrifuger pendant 10 min à 5000 g pour éliminer l'insoluble,
 - atomiser le concentré protéique (rendement de l'atomisation sur la base de l'extrait sec : 82,90 % en poids).

- 9 -

Exemple 10 :

En seconde variante de l'exemple 8, on peut réaliser les opérations suivantes :

- ajuster le pH d'une partie de l'extrait préparé selon l'exemple 8 à pH 5 par addition de H₂SO₄ 4N,
- laisser reposer une heure à température ambiante,
- centrifuger,
- recueillir le précipité,
- reconstituer le précipité dans 10 % du volume avant précipitation sans effectuer l'étape de lavage,
- ajuster le pH à 7,5 en ajoutant sous agitation NaOH 4N,
- homogénéiser pour favoriser la solubilisation et l'homogénéisation,
- centrifuger pendant 10 min à 5000 g pour éliminer l'insoluble,
- atomiser le concentré protéique.

L'analyse en perméation de gel sur colonne du type superose 12 HR des fractions extraites par les différentes méthodes décrites ci-dessus permet de caractériser au moins 6 fractions différentes comme le montrent les diagrammes des figures 1 à 6 des dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un extrait de farine de graines entières d'*Hibiscus esculentus* (extraction : 2 heures à température ambiante dans l'eau, pH = 9),
- la figure 2 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un extrait de farine de graines décortiquées d'*Hibiscus esculentus* (extraction : 1,5 heure à température ambiante dans l'eau, pH = 9),
- la figure 3 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un extrait de farine de graines décortiquées d'*Hibiscus esculentus* (extraction : 1,5 heure à température ambiante dans du NaCl 10g/l, pH = 9),
- la figure 4 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un extrait de farine de graines décortiquées d'*Hibiscus esculentus* (extraction dans un tube à ultrasons, 1 heure dans du NaCl 5g/l, pH = 7,5),
- la figure 5 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un concentré protéique obtenu par précipitation à pH = 4,1 d'un extrait de farine de graines entières d'*Hibiscus esculentus*, et,
- la figure 6 représente la répartition des poids moléculaires des protéines d'un concentré protéique obtenu par précipitation à pH = 5 d'un extrait de farine de graines entières d'*Hibiscus esculentus*.

- 10 -

Le tableau récapitulatif suivant (en deux parties) montre la répartition des différentes fractions protéiques extraites.

Conditions d'extraction	pH = 9 eau	pH = 9 NaCl 1g/l	pH = 9 NaCl 5g/l	pH = 9 NaCl 10g/l	pH = 6,5 NaCl 5g/l	pH = 8 NaCl 5g/l
						4 h
PM > 500 000 Da	13,7	9,8	4,4	3,7	2,9	2,7
PM compris entre 100 000 et 500 000 Da	12,2	11,2	10,7	14,4	9,7	17,3
PM compris entre 30 000 et 100 000 Da	4	3,3	7,6	7,7	14,7	7,9
PM compris entre 5 000 et 30 000 Da	41,2	44,7	46,3	51,2	49,6	45,9
PM inférieur ou égal à 5 000 Da	28,9	31	31	23	23,1	26,2

Conditions d'extraction	pH = 7,5 NaCl 5g/l	pH = 7,5 NaCl 5g/l	pH = 7,5 NaCl 5g/l	pH = 9 H ₂ O	Concentré protéique	Concentré protéique
	6 h	15 min US	60 min US	farine totale	(pH 4,1)	(pH 5)
PM > 500 000 Da	4	13	20,9	30,5	35,5	46,6
PM compris entre 100 000 et 500 000 Da	13,1	14,2	3,8	15	12,2	17,5
PM compris entre 30 000 et 100 000 Da	4,3	6,1	15,1	5,9	8,1	7,3
PM compris entre 5 000 et 30 000 Da	50,2	46	35,3	26,4	35,4	22,6
PM inférieur ou égal à 5 000 Da	28,4	20,7	24,9	22,2	8,8	6

5

Les 6 fractions protéiques précitées sont constituées par :

- une fraction (notée F1) de très haut poids moléculaire (entre 1 000 000 et 1 500 000 Da d'après l'étalonnage de la colonne),
- une fraction (notée F2) de poids moléculaire compris entre 250 000 et 350 000 Da surtout visible sur les extraits de farine de graines entières,
- une fraction (notée F3) de poids moléculaire compris entre 130 000 et 180 000 Da,

10

- 11 -

- une fraction (notée F4) qui correspond à un poids moléculaire compris entre 17 000 et 22 000 Da,

- deux fractions de poids moléculaires respectivement d'environ 3300 Da (F5) et d'environ 2300 à 2600 Da (F6).

5 Selon les conditions d'extraction, la fraction F1 constitue entre 2,7 et 50,00 % des protéines et la fraction F4 constitue entre 16 et 52 % (moyenne 40 %) des protéines totales.

On note que, plus le solvant d'extraction contient de sels au départ et moins la fraction F1 est importante.

10 Les extraits obtenus au moyen des exemples de procédés décrits sont directement utilisables sous forme liquide ou après séchage selon les techniques conventionnelles de déshydratation (atomisation, lyophilisation ...).

Les fractions protéiques extraites selon les exemples indiqués précédemment présentent l'avantage, par rapport à l'état naturel dans lequel elles se trouvent dans les graines, d'avoir une structure chimique native identique, de pouvoir être partiellement ou totalement purifiées (c'est-à-dire être débarrassées des autres constituants des graines tels que les lipides, les fibres, les glucides ou analogues), et d'avoir une composition modulable en fonction du procédé d'extraction et/ou de purification mis en oeuvre (protéines totales de l'extrait brut, concentré protéique ou fraction(s) protéique(s) purifiée(s)).

20 On relève, par rapport à la caséine lactique, une solubilité améliorée, en plus de l'origine végétale renouvelable recherchée dans le domaine cosmétique, ce tout en conservant une composition en acides aminés proche de la caséine dont on connaît les propriétés nutritionnelles, hydratantes et filmogènes pour la peau et les phanères.

25 Les fractions protéiques peuvent être utilisées soit sous leur forme native sans modification des structures initiales, soit sous la forme d'association(s) naturelle(s) de deux ou de toutes les fractions extraites correspondant aux différents pics des chromatogrammes représentés sur les dessins annexés, ou encore sous forme isolée, c'est-à-dire utilisation d'une ou de plusieurs fractions correspondant à un ou des pics des chromatogrammes précités.

30 Les fractions protéiques peuvent également être utilisées sous leur forme modifiée ou fonctionnalisée par l'un quelconque des traitements suivants :

- polymérisation,
- 35 - hydrolyse chimique des protéines d'Hibiscus.
- hydrolyse enzymatique des protéines d'Hibiscus. Dans ce but, des protéases provenant d'extraits d'origines animale, végétale, microbienne ou

- 12 -

fongique peuvent être utilisées pour modifier les protéines d'Hibiscus : Pepsine, Trypsine, Chymotrypsine / Papaïne, Pronase, Bromelaïne / Endoprotéinase, Thermitase, Protéases de *Bacillus subtilis*, d'*Aspergillus Niger* et d'*Aspergillus Oryzae* / Subtilisine, Alcalase, Neutrase.

5 - transformation microbiologique avec utilisation des protéines d'Hibiscus en tant que substrat de fermentation par divers micro-organismes tels que des levures (*Saccharomyces*), des moisissures (du type *Aspergillus*), des bactéries telles que *Bacillus* ou analogues.

10 - fonctionnalisation chimique ou enzymatique par des procédés tels que la désamidation, la succinylation ou la phosphorylation.

- quaternisation.

- greffage de molécules saccharidiques ou lipidiques.

15 L'invention a également pour objet une composition cosmétique, notamment à application topique pour la peau et/ou les phanères, caractérisée en ce qu'elle contient en tant que substitut de caséine au moins une fraction protéique, préférentiellement soluble, extraite de graines d'Hibiscus esculentus.

20 Selon une caractéristique de l'invention, la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) extraite(s) de farine non délipidée ou délipidée de graines entières ou décortiquées d'Hibiscus esculentus par l'eau ou des solutions salines à différents pH.

25 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) extraite(s) en solution aqueuse sous l'action d'ultrasons et cette ou ces fraction(s) protéique(s) est (sont) purifiée(s) par un procédé de purification choisi dans le groupe formé par la précipitation, l'adsorption, la chromatographie d'échange d'ions ou d'affinité et l'ultrafiltration.

30 La fraction protéique totale ou native au moins présente est choisie dans le groupe des fractions protéiques totales et natives extraites de graines d'Hibiscus esculentus et présentant en filtration sur gel des poids moléculaires apparents de 1 000 000 à 1 500 000 Da, 250 000 à 350 000 Da, 130 000 à 180 000 Da, 17 000 à 22 000 Da, 3 300 Da et 2 300 à 2 600 Da.

35 La ou les fraction(s) protéique(s) précitée(s) peut (peuvent) consister en un hydrolysate chimique ou enzymatique préparé à partir de protéines natives, être obtenue(s) par polymérisation ou dépolymérisation de protéines natives ou être chimiquement modifiée(s) par greffage.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la composition cosmétique contient au moins deux fractions protéiques de poids moléculaires apparents différents.

- 13 -

Conformément à un second mode de réalisation de l'invention la composition cosmétique contient un extrait de graines d'Hibiscus esculentus constitué par l'ensemble des fractions protéiques solubles présentes naturellement dans ces graines.

5 Ladite composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comporte préférentiellement entre 0,01 % et 50,00 % en poids, préférentiellement entre 1 % et 25 % en poids, de fraction(s) protéique(s) extraite(s) de graines d'Hibiscus esculentus, telle(s) qu'obtenue(s) par l'un quelconque des exemples de procédés d'obtention décrits précédemment.

10 A titre d'exemples non limitatifs de réalisations pratiques de l'invention, on décrira ci-après différents produits ou compositions cosmétiques comprenant au moins une fraction protéique soluble extrait de graines d'Hibiscus esculentus ou Okra.

Exemple 1 :

15 Un produit cosmétique conforme à l'invention, sous forme de crème de jour hydratante et adoucissante pour le visage et le corps pourra, par exemple, présenter une composition pondérale, constituée à partir des fractions A, B, C et D suivantes, telle qu'indiquée ci-après.

Fraction A :

20	- Cutina MD	14,00 %
	- Eutanol G	6,00 %
	- Cétiol B	6,00 %
	- Eumulgin B1	1,50 %
	- Eumulgin B2	1,50 %

25 Fraction B :

	- Extraits de protéines totales natives d'Hibiscus selon l'exemple n° 1 précité	8,00 %
--	---	--------

Fraction C :

	- Allantoïne	0,20 %
30	- Methylparaben	0,20 %
	- Germall 115	0,30 %
	- Eau distillée	62,00 %

Fraction D :

	- Parfum	0,30 %
--	----------	--------

35 Le procédé de préparation et de fabrication de la crème de jour précitée consiste essentiellement à chauffer la fraction A à 75° C, à préparer la fraction C à 75° C, à verser la fraction A dans la fraction B, sous agitation turbine, à ajouter la fraction

- 14 -

C vers 50° C, puis à continuer l'agitation planétaire jusqu'à température ambiante et, enfin, à ajouter la fraction D.

Exemple 2 :

Un produit cosmétique conforme à l'invention, sous forme de crème réparatrice restructurante, anti-rides et nourrissante pour la nuit pourra, par exemple, présenter une composition pondérale, constituée à partir des fractions A, B, C et D suivantes, telle qu'indiquée ci-après.

Fraction A :

	- Miglyol 810	6,00 %
10	- Myrj 51	3,00 %
	- Arlatone 983 S	2,00 %
	- Acide stéarique TP	4,00 %
	- Alcool cétylique	3,00 %

Fraction B :

15	- Propylène Glycol	3,00 %
	- Elestab LS 388 (Laboratoires Serobiologiques)	2,50 %
	- Eau distillée	61,20 %

Fraction C :

	- Extraits atomisé de protéines natives d'Hibiscus	
20	selon l'exemple n° 9 précité	2,00 %
	- Eau distillée	13,00 %

Fraction D :

	- Parfum	0,30 %
--	----------	--------

Le procédé de préparation et de fabrication de la crème de nuit précitée consiste essentiellement à préparer et à chauffer les fractions A et B à 75° C, à verser la fraction A dans la fraction B, sous agitation turbine, à préparer (séparément et extemporanément) le soluté de la fraction C par agitation de l'atomisat dans l'eau distillée, à ajouter la fraction C dans l'émulsion A + B en cours de refroidissement vers 50° C, puis à continuer en agitation planétaire à partir de 45° C et jusqu'à température ambiante, en ajoutant le parfum vers 40° C.

Exemple 3 :

Un produit cosmétique conforme à l'invention, sous forme de microémulsion protectrice, conditionneuse, coiffante et photoprotectrice pour cheveux pourra, par exemple, présenter une composition pondérale, constituée à partir des fractions A, B, C et D suivantes, telle qu'indiquée ci-après.

Fraction A :

	- Brij 96	11,80 %
--	-----------	---------

- 15 -

- Arlatone G 10,00 %
- Huile de paraffine 13,00 %

Fraction B :

- Eau distillée 53,70 %
- 5 - Méthylparaben 0,20 %
- Elestab 4112 (Laboratoires Sérobiologiques) 0,30 %

Fraction C :

- Protéines natives d'Hibiscus sous forme de concentré protéique selon l'exemple n° 6 précité 5,00 %
- 10 - Eau distillée 5,00 %

Fraction D :

- Parfum 0,20 %
- Tween 20 0,80 %

Le procédé de préparation et de fabrication de la micro-émulsion précitée consiste
essentiellement à préparer et à chauffer les fractions A et B à 75° C, à verser la
fraction A dans la fraction B, sous agitation turbine, à réaliser un refroidissement
progressif et, vers 50 ° C, à ajouter la fraction C puis la fraction D, et à poursuivre
l'agitation jusqu'à refroidissement à température ambiante et homogénéisation
parfaite.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation
décrits et représentés aux dessins annexés. Des modifications restent possibles,
notamment du point de vue de la constitution des divers éléments ou par
substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour autant du domaine de
protection de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins une fraction protéique de graines d'Hibiscus esculentus ou Okra dans une composition ou un produit cosmétique.

2. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle contient en tant que substitut de caséine au moins une fraction protéique extraite de graines d'Hibiscus esculentus.

3. Composition cosmétique selon la revendication 2, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) extraite(s) de farine non délipidée ou délipidée de graines entières ou décortiquées d'Hibiscus esculentus par l'eau ou des solutions salines à différents pH.

4. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 et 3, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) extraite(s) en solution aqueuse sous l'action d'ultrasons.

5. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) purifiée(s) par un procédé de purification choisi dans le groupe formé par la précipitation, l'adsorption, la chromatographie d'échange d'ions ou d'affinité et l'ultrafiltration.

6. Composition cosmétique selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que la fraction protéique totale ou native est choisie dans le groupe des fractions protéiques totales et natives extraites de graines d'Hibiscus esculentus et présentant en filtration sur gel des poids moléculaires apparents de 1 000 000 à 1 500 000 Da, 250 000 à 350 000 Da, 130 000 à 180 000 Da, 17 000 à 22 000 Da, 3 300 Da et 2 300 à 2 600 Da.

7. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) consiste(nt) en un hydrolysat chimique ou enzymatique préparé à partir de protéines natives.

8. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) obtenue(s) par polymérisation de protéines natives.

9. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que la ou les fraction(s) protéique(s) est (sont) chimiquement modifiée(s) par greffage.

- 17 -

10. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient au moins deux fractions protéiques de poids moléculaires apparents différents.

5 11. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient un extrait de graines d'*Hibiscus esculentus* constitué par l'ensemble des fractions protéiques solubles présentes naturellement dans ces graines.

10 12. Composition cosmétique selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisée en ce qu'elle comporte entre 0,01 % et 50,00 % en poids de fraction(s) protéique(s) extraite(s) de graines d'*Hibiscus esculentus*.

% en poids

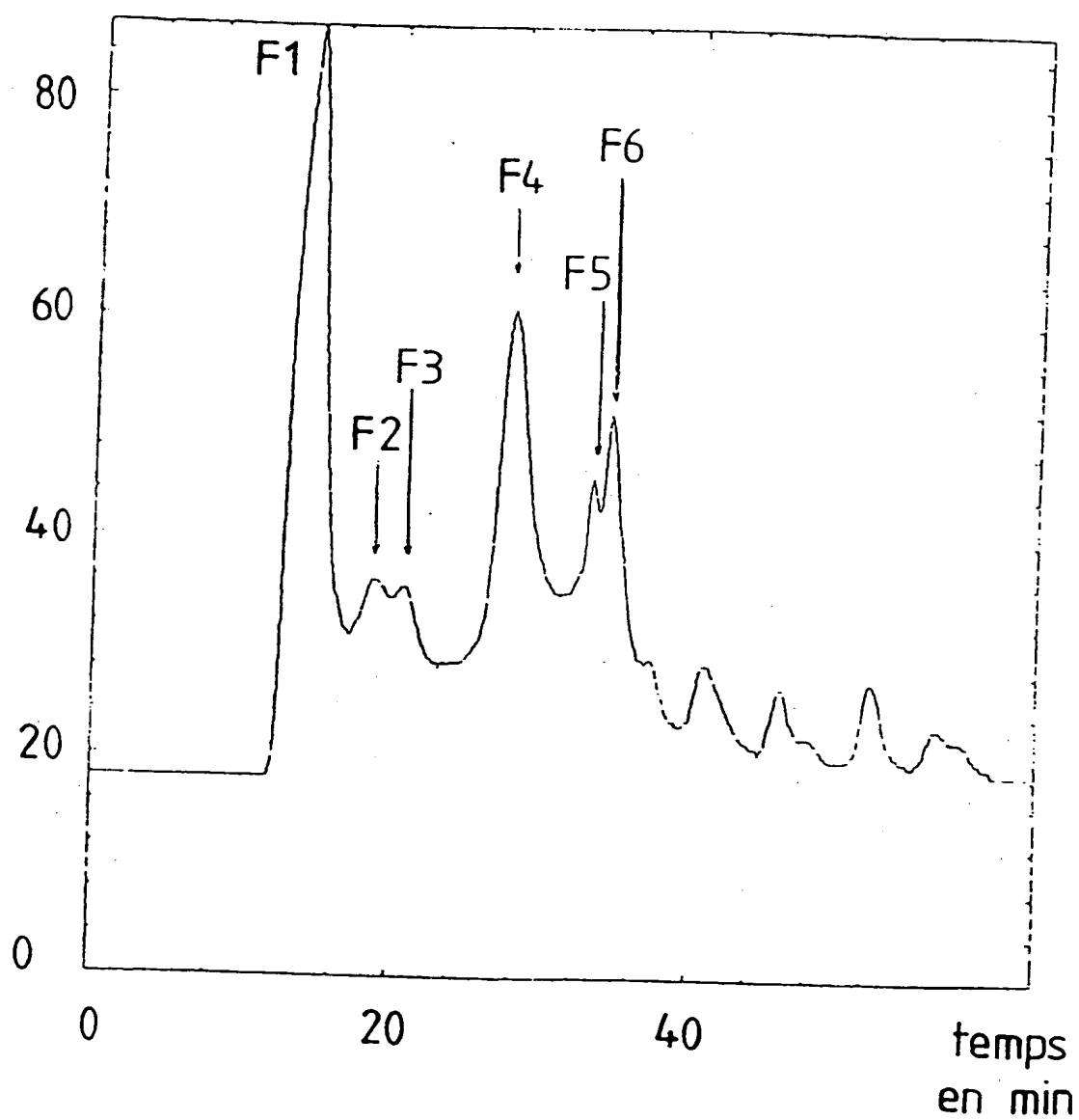


Fig- 1

% en poids

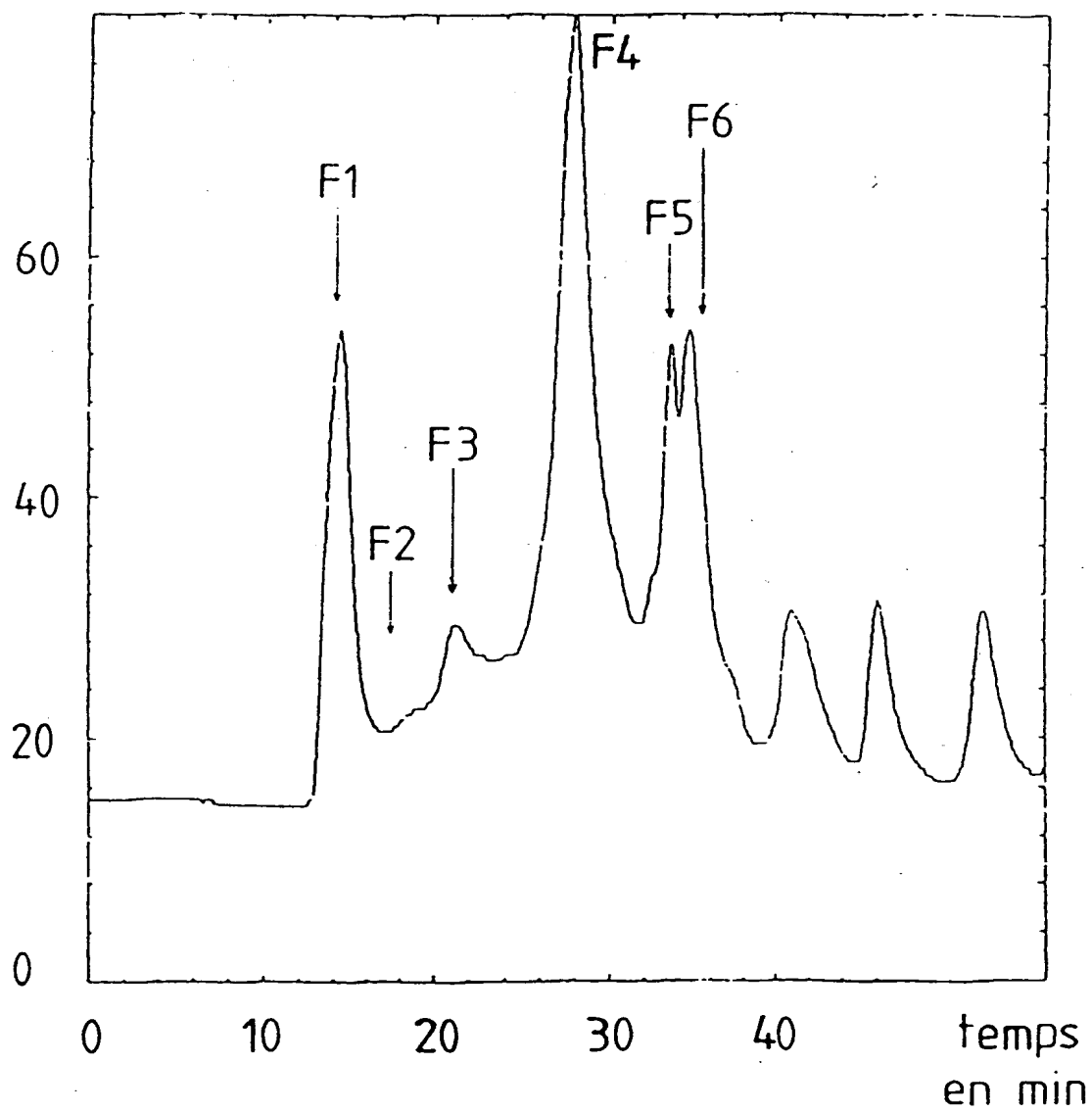


Fig-2

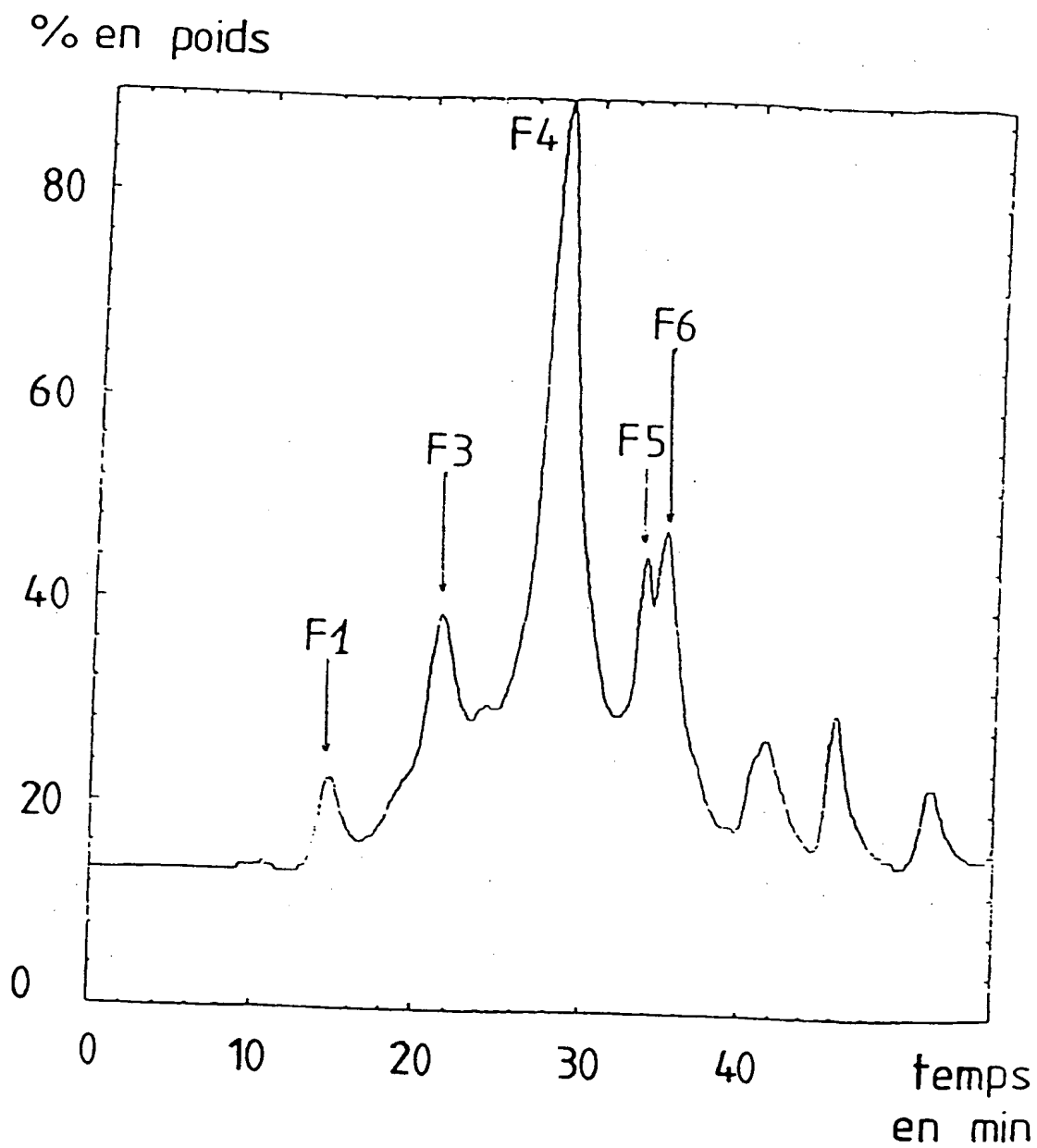


Fig-3

% en poids

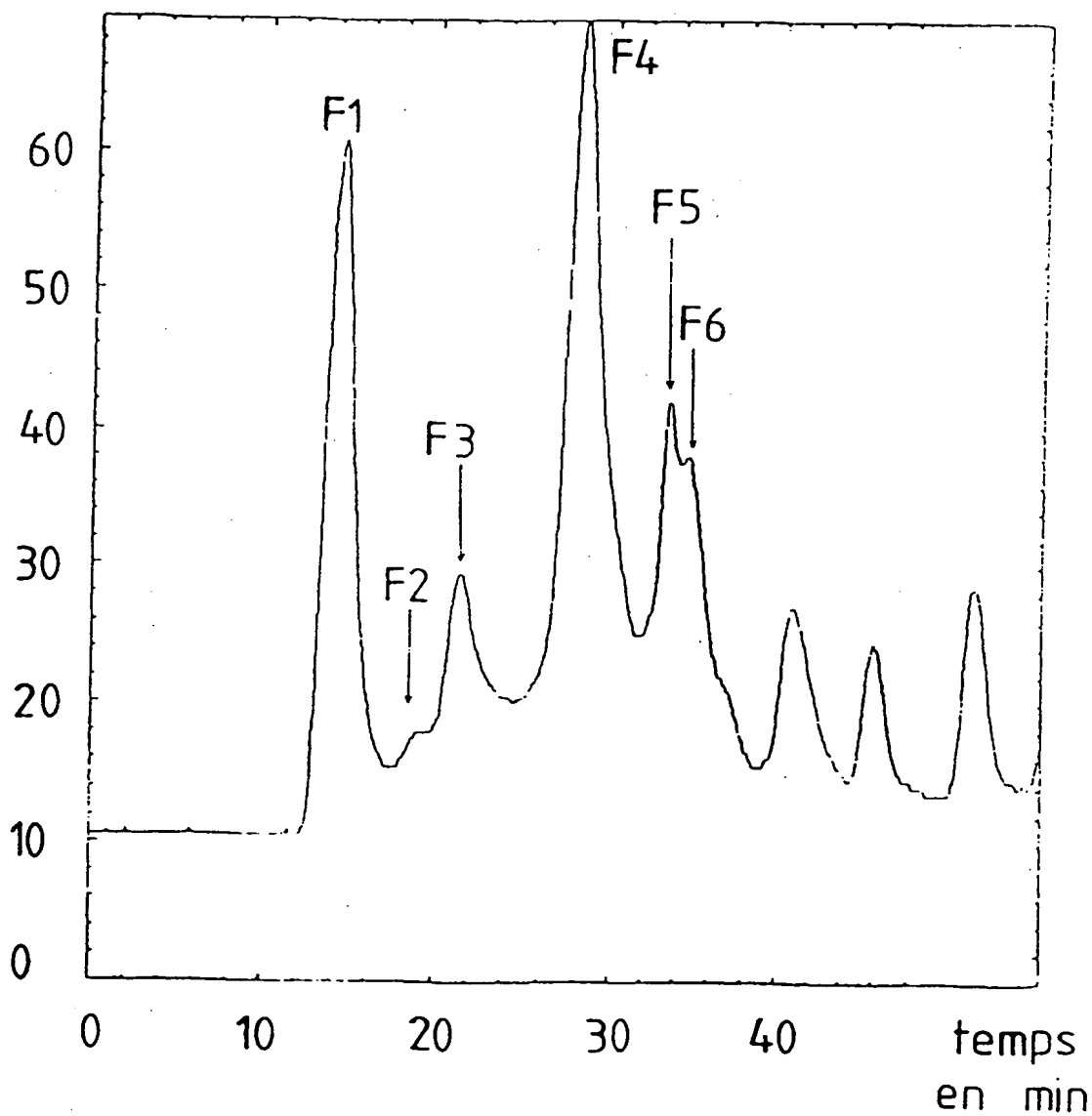


Fig - 4

% en poids

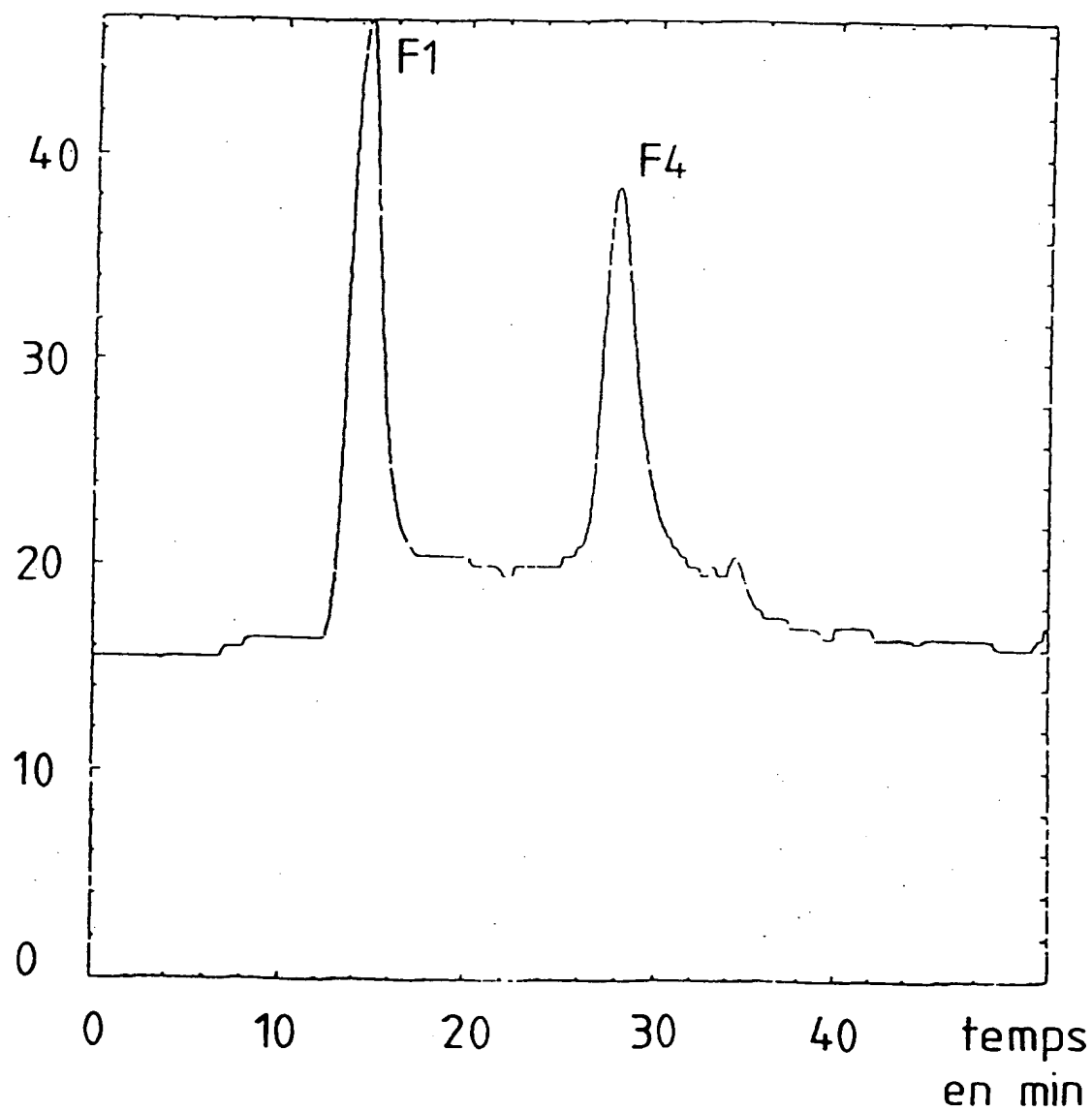


Fig-5

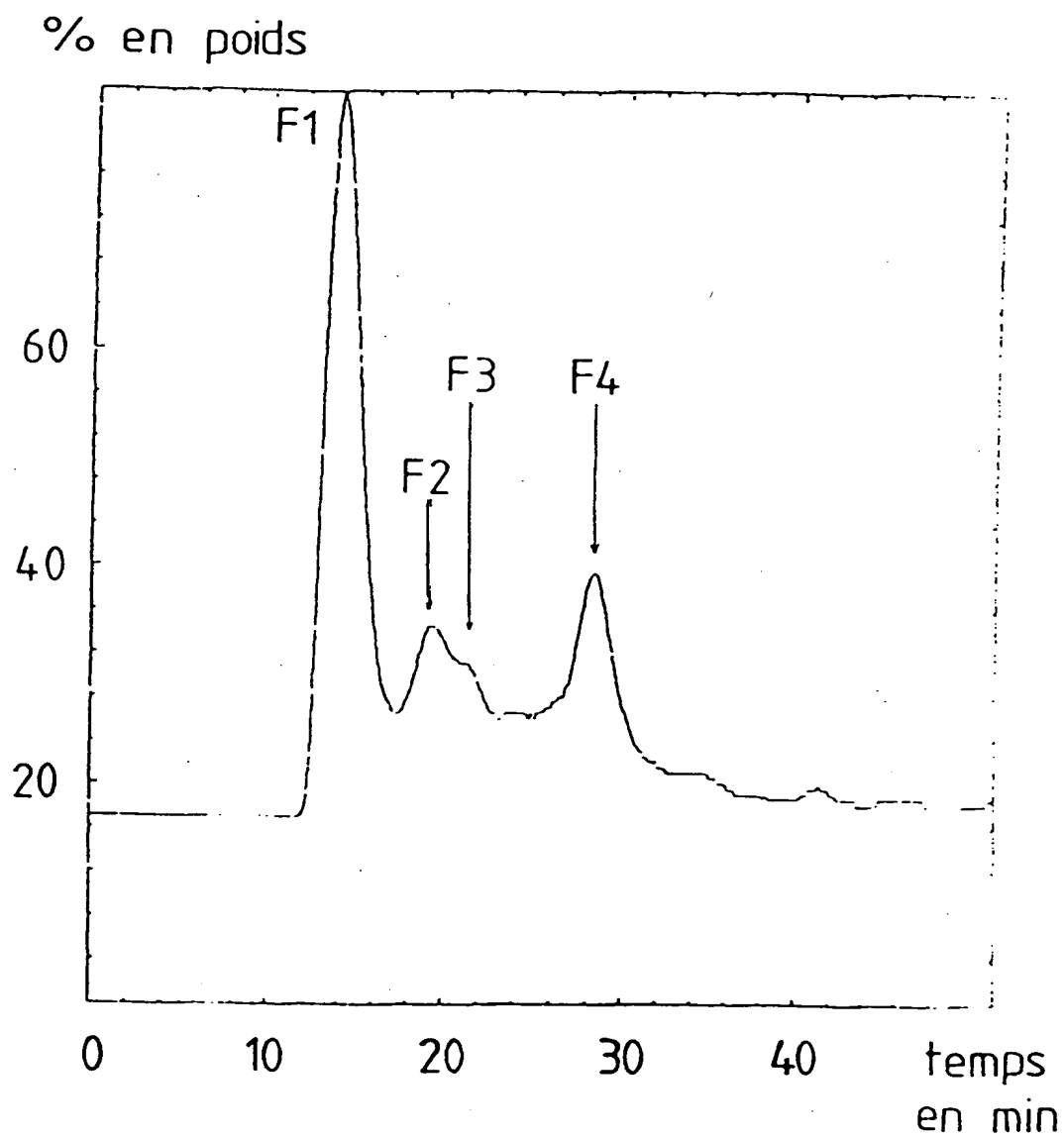


Fig-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K7/48 A61K7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRYANT ET AL.: "processing, functional, and nutritional properties of okra seed products" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 53, no. 3, 1988, pages 810-816, XP002049248 cited in the application see the whole document ---	1-12
A	DATABASE WPI Week 8327 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 83-702268 XP002049249 & JP 58 088 305 A (NIKKO CHEM CO) see abstract --- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 1998

Date of mailing of the international search report

06/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fischer, J.P.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No

PCT/FR 98/00715

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 679 443 A (FAURE) 29 January 1993 cited in the application see the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 98/00715

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2679443 A	29-01-1993	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Indice International No

PCT/FR 98/00715

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K7/48 A61K7/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BRYANT ET AL.: "processing, functional, and nutritional properties of okra seed products" JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 53, no. 3, 1988, pages 810-816, XP002049248 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-12
A	DATABASE WPI Week 8327 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 83-702268 XP002049249 & JP 58 088 305 A (NIKKO CHEM CO) voir abrégé --- -/--	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 juillet 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/08/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fischer, J.P.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale No
PCT/FR 98/00715

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 679 443 A (FAURE) 29 janvier 1993 cité dans la demande voir le document en entier -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

and internationale No

PCT/FR 98/00715

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2679443 A	29-01-1993	AUCUN	

THIS PAGE BLANK (USPTO)